



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

VLIR-Network Ecuador

Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento

Evaluación de las variables altitud y composición del suelo sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos lipofílicos de *Hypericum laricifolium* Juss por *fingerprint* cromatográfico

Trabajo de Titulación previo a la
obtención del título de Magister
en Biociencias Aplicadas

AUTOR: Bqf. Carmen Maribel Ortega Puma (Universidad de Cuenca)

Cl.: 0103823365

TUTOR: Dr. Fabián León Tamariz PhD (Universidad de Cuenca)

Cl.: 0102311610

COTUTOR: Dr. Efrén Germán Santos Ordoñez PhD (ESPOL)

Cl.: 0908897135

ASESOR: Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa PhD (Universidad de Cuenca)

Cl.: 0301082897

Cuenca, Ecuador

2017



RESUMEN

Hypericum laricifolium Juss se utiliza para el tratamiento de infecciones microbianas. Su perfil metabólico secundario es influenciado por distintas variables ambientales. Se busca evaluar el efecto de la altitud y composición de suelos sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos lipofílicos de *Hypericum laricifolium* evaluando 29 individuos y sus muestras de suelo recolectados en diferentes ambientes, y construir un modelo predictivo de su efecto utilizando fingerprint cromatográfico mediante HPLC. En el suelo se analizaron pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio. Los extractos se obtuvieron mediante fluidos supercríticos. Para la identificación molecular se secuenciaron los loci para ITS1, ITS2 y rbcL. La identidad para ITS1 e ITS2 fue del 100% y 99,7% respectivamente, rbcL mostró identidad de género (98,5%). La actividad antibacteriana fue evaluada mediante microdilución en placa frente a SARM, evidenciando alta actividad. Mediante mínimos cuadrados parciales (PLS) se estableció correlación entre la actividad antibacteriana y los perfiles cromatográficos a 254, 280 y 360 nm. El modelo fue construido usando los individuos con sus réplicas, con 7501 variables X (respuestas en los diferentes tiempos de retención), variable y (CI50 de cada individuo) y fue evaluado usando parámetros de correlación R^2 . El modelo a 254 nm predijo mejor la actividad antibacteriana ($R^2=0,92$).

Palabras clave:

Altitud, código de barra molecular, composición suelo, efecto antimicrobiano, *Fingerprint* cromatográfico, *Hypericum laricifolium*.



ABSTRACT

Hypericum laricifolium Juss is used for the treatment of microbial infections. The secondary metabolic profile and hence the biological activity could be influenced by several environmental variables. The aim of this work was to evaluate the effect of altitude and soil compositions on the antibacterial and antifungal activity of lipophilic extracts of *Hypericum laricifolium*, by evaluating 29 individuals and their soil samples obtained in different environmental conditions and to get a predictive model of their effect using fingerprint chromatography by HPLC. Soil samples were analyzed for pH, electrical conductivity, organic matter, nitrogen, phosphorus and potassium. The extracts were obtained by supercritical fluid extraction. For molecular identification, the *loci* ITS1, ITS2 and *rbcL* were sequenced. The identity for ITS1 and ITS2 was 100% and 99.7% respectively, *rbcL* exhibited genus identity (98,5%). The antibacterial activity was performed by micro-dilution technique against MRSA. A high activity has been detected. Using partial least squares (PLS) a correlation was established between antibacterial activity and chromatographic profiles at 254, 280 and 360 nm. The model was constructed using the individuals with their replicas, with 7501 X variables (responses at different retention times), variable y (IC50 of each individual). The model was evaluated using R^2 correlation parameters, the model at 254 nm predicted better the antibacterial activity ($R^2=0.92$).

Key words:

Altitude, antimicrobial effect, chromatography fingerprint, *Hypericum laricifolium*, molecular barcode, soil composition



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	11
2. Metodología	13
2.1 Área de estudio y muestreo	13
2.2 Análisis de suelos	13
2.3 Identificación molecular barcode de <i>H. laricifolium</i>	13
2.4 Preparación de los extractos de <i>H. laricifolium</i>	14
2.5 Test de actividad antibacteriana	14
2.6 Test de actividad antifúngica	14
2.7 Análisis HPLC	15
2.8 Análisis de datos	15
2.9 Análisis fingerprint cromatográfico y desarrollo de un modelo de la actividad antibacteriana	16
3. Resultados y Discusión	16
3.1 Individuos muestreados	16
3.2 Componentes del suelo	17
3.3 Clasificación taxonómica	17
3.4 Evaluación de la actividad antibacteriana	18
3.5 Evaluación de la actividad antifúngica	19
3.6 Actividad antibacteriana y altitud	19
3.7 Actividad antibacteriana y composición del suelo	20
3.8 Fingerprint cromatográfico de <i>H. laricifolium</i>	21
4. Conclusiones	25
Referencias	27
ANEXOS	34



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de muestreo de las 8 localidades en 3 provincias del Ecuador.....	17
Tabla 2. CI50 determinados para <i>H.laricifolium</i>	19
Tabla 3. Resultados comparativos de los coeficientes de correlación en los modelos de predicción a 254, 280 y 360 nm.....	23



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Amplicon generado del loci <i>rbcL</i> (banda esperada 600 pb); (b) Amplicon generado del loci ITS1 (banda esperada 707 pb; obtenido del tejido foliar de <i>H. laricifolium</i>	18
Figura 2. (a) Microdilución en placa de extractos de <i>H. laricifolium</i> , 5 concentraciones de 68-0,25 ug/mL, después de 24 h de incubación; (b) Determinación de la actividad bactericida o bacteriostática de las concentraciones inhibitorias de SARM-Medio TSA.	18
Figura 3. Señales fingerprint obtenidas de cada muestra en el análisis HPLC21	
Figura 4. Correlación entre la actividad antibacteriana predictiva y experimental de las muestras usadas para la calibración del modelo a 254 nm	23
Figura 5. Número de componentes principales en función del RMSECV	24
Figura 6. Resultados de los modelos en sus respectivas regresiones (a) 254 nm; (b) 280 nm; (c) 360 nm	25



Universidad de Cuenca

Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

Carmen Maribel Ortega Puma en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de las variables altitud y composición del suelo sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos lipofílicos de *Hypericum laricifolium* Juss por *fingerprint* cromatográfico", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 01 de septiembre de 2017

Carmen Maribel Ortega Puma

C.I: 0103823365



Universidad de Cuenca
Cláusula de Propiedad Intelectual

Carmen Maribel Ortega Puma, autor/a del trabajo de titulación "Evaluación de las variables altitud y composición del suelo sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos lipofílicos de *Hypericum laricifolium* Juss por *fingerprint* cromatográfico", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 01 de septiembre de 2017

Carmen Maribel Ortega Puma

C.I: 0103823365



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme sabiduría para culminar ésta meta profesional y personal. Gracias a mis hijas Tamara e Ibén Scarlett por acompañarme en éste proceso y a mi esposo Adrian por su apoyo. Gracias al Dr. Fabián León por su guía en este trabajo de investigación, a la Dra. Johana Ortiz por su colaboración y ayuda, y al conjunto de postgrados de la red VLIR-Network Ecuador.



DEDICATORIA

A mi Dios, Adrian, Tamara e Ibén Scarlett.



Evaluación de las variables altitud y composición del suelo sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos lipofílicos de *Hypericum laricifolium* Juss por *fingerprint* cromatográfico

Carmen Ortega Puma¹, Johana Ortíz Ulloa¹, Vladimiro Tobar Solano¹, Efrén Santos Ordoñez², Lourdes Jerves Andrade¹, Nancy Cuzco Quizhpi¹, Fabián León Tamariz¹.

¹ Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, carmen.ortega@ucuenca.ec

² Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida gsantos@espol.edu.ec

1. Introducción

El uso indiscriminado de antimicrobianos ha provocado un aumento en la resistencia microbiana, a esto se suma la presencia de efectos no deseados y la aparición de nuevas infecciones han puesto en alerta a la población mundial, considerando éste problema como una grave amenaza para la salud pública, siendo de vital importancia la búsqueda de nuevas fuentes de principios activos con propiedades antimicrobianas (Li et al., 2015; OMS, 2014).

La medicina tradicional ha utilizado plantas medicinales durante siglos para el tratamiento de diversas afecciones de salud, entre ellas, para infecciones microbianas (Tistaert, Dejaegher, & Vander Heyden, 2011). Al igual que otras aplicaciones medicinales, el potencial terapéutico se atribuye mayoritariamente a la presencia de los llamados metabolitos secundarios. *Hypericum laricifolium* Juss es una especie nativa de los Andes, también conocida como romerillo, matequillcana, escobilla o bora, es utilizada para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias (Bussmann et al., 2010; Elif et al., 2008; Jerves et al., 2014; Ruiz & Huamaní, 2005; Saroglou, Petar, Rancic, Veljic, & Skaltsa, 2007). Estudios previos atribuyen estas propiedades a metabolitos con actividad antimicrobiana, como los derivados acilfloroglucinoles de naturaleza apolar, que pueden ser aislados especialmente en extractos lipofílicos (Ccana-Ccapatinta, Barros, Bridi, & Poser, 2015; Ccana-Ccapatinta & von Poser, 2015; Fobofou et al., 2015; Zhou, Zhang, Pan, Luo, & Kong, 2014).

Su perfil metabólico como el de muchos seres vivos, puede ser influenciado por distintas variables ambientales como la altitud, humedad, precipitación, radiación solar y la composición del suelo en el cual se desarrolla la planta. Esta variabilidad puede generar modificaciones sobre el efecto biológico ejercido por la planta, así, existen varios estudios que demuestran la influencia de la altitud sobre los metabolitos secundarios de la especie *Sinodophyllum hexadrum*, en donde el contenido de flavonoides (responsables de la actividad



antioxidante y antiviral) incrementó en las plantas obtenidas a mayor altitud y por el contrario el contenido de ligninas (responsables de la actividad anticancerígena) fue más elevado a menor altitud (Dong, Ma, Wei, Peng, & Zhang, 2011; Liu, Liu, Yin, & Zhao, 2015; Zidorn & Stuppner, 2001). Otros estudios muestran la influencia de la radiación ultravioleta sobre los metabolitos secundarios (Cuadra, Harborne, & Waterman, 1997; Wilson, Wilson, & Greenberg, 1998), en el género *Eucommia* la relación altitud y contenido de flavonoides fue directamente proporcional (Dong et al., 2011). En *Hypericum perforatum* la temperatura incrementó el contenido de hiperacina (Zobayed, Afreen, & Kozai, 2005), la iluminación afectó el metabolismo de *Eucommia ulmoides* y su ácido geniposídico (Dong et al., 2011), la fotorespiración reveló ser una estrategia útil a gran altura, en cultivos de cebada y trigo se observó mayor incremento de la peroxidasa a mayor altitud (Kumar, Kumar, & Ahuja, 2005). Nuevas investigaciones mostraron que componentes del suelo como el pH, materia orgánica y potasio influenciaron sobre los metabolitos secundarios con acción antitumoral en *S. hexadrum* (Dong et al., 2011; Liu et al., 2015). Sin embargo, existe poca investigación de los atributos medicinales de *H. laricifolium*, y tampoco se ha considerado la influencia de las variables ambientales sobre su actividad biológica, ya que estas últimas pueden ser estresores de la planta y determinar de este modo la producción de metabolitos secundarios, con una influencia directa sobre la actividad farmacológica (Dong et al., 2011; Liu et al., 2015; Yang et al., 2005; Zidorn & Stuppner, 2001).

Hoy en día, existen herramientas cromatográficas que permiten separar los componentes químicos individuales de una planta y obtener así su perfil metabólico característico conocido como *fingerprint* (Bansal, Chhabra, Rawal, & Sharma, 2014), su uso permite realizar controles de calidad herbal, solucionar problemas de autenticación, (adulteración o confusión entre especies), determinar picos de interés (metabolitos) (Tistaert et al., 2011), proveer la información necesaria para evaluar la influencia de factores ambientales sobre el perfil metabólico de una especie y desarrollar modelos predictivos de su actividad biológica, mediante el uso de herramientas estadísticas y análisis PLS, el cual es una técnica ampliamente utilizada con gran poder predictivo, que utiliza los datos obtenidos del *fingerprint* para encontrar la relación entre las variables predictoras *X* y la variable respuesta *y* (actividad biológica), construyendo así nuevas variables capaces de predecir su actividad (Liu et al., 2015; Tistaert et al., 2011).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la altitud y la composición del suelo sobre las actividades antibacteriana y antifúngica de extractos lipofílicos de *Hypericum laricifolium* Juss, mediante análisis de fingerprint cromatográfico.



2. Metodología

2.1 Área de estudio y muestreo

La recolección de los especímenes se realizó en 3 provincias ecuatorianas, en la región andina del Azuay, Loja y Cañar, en un rango de altitud de 2.596 a 3.509 m.s.n.m, bajo la supervisión de la Blga. María Cecilia Carrasco; las especies fueron utilizadas en investigaciones previas y contaban con el respectivo marcaje de individuos taxonómicamente caracterizados (Jerves et al., 2014). El tipo de muestreo fue dirigido (Tongco, 2007). Se tomaron muestras del suelo del lugar donde creció cada individuo, según el protocolo descrito por la *Food Agriculture Organization* (FAO), se recolectó 2 kg de suelo de alrededor de la copa del arbusto, removiendo la hojarasca depositada sobre el suelo y llegando a una profundidad entre 20-30 cm (FAO, 2009).

2.2 Análisis de suelos

Para el análisis de suelo se contrató los servicios del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Los parámetros analizados fueron pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, nutrientes totales de nitrógeno, fósforo, potasio (Liu Wei et al., 2015). La metodología para la determinación de pH fue potenciométrica (suelo: agua/ 1:2,5), la conductividad eléctrica se evaluó por extracto de pasta saturada, la materia orgánica por medición del carbono orgánico total, nitrógeno y fósforo por colorimetría, y potasio a través de absorción atómica.

2.3 Identificación molecular barcode de *H. laricifolium*

La identificación de los especímenes se realizó mediante la técnica molecular *barcode*, a través de la secuenciación del ADN de fragmentos obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los *loci rbcL*, ITS1 e ITS2. Se extrajo el ADN a partir de las hojas frescas de diferentes individuos de cada localidad de muestreo (n=15). La extracción de ADN siguió el protocolo CTAB modificado (protocolo establecido por el laboratorio de Biología Molecular del CIBE-ESPOL), de Doyle (1987). Se obtuvieron los amplicones por PCR a 56°C (Eppendorf, Hamburg, Germany) (Anexo 1 y 2). Para la secuenciación de los fragmentos de ADN (5-60 ng/μl) se contrataron los servicios de la empresa de secuenciación Macrogen (Maryland, EE.UU). Los resultados fueron comparados mediante BLAST en las bases de datos de secuencias genéticas disponibles en el software Geneious 9.1.6 y en GenBank (Chen et al., 2010; Costa et al., 2016; Manzano, Miranda, Gutiérrez, Santos, & Scull, 2014; Purty & Chatterjee, 2016).



2.4 Preparación de los extractos de *H. laricifolium*

Se seleccionaron las partes aéreas de la planta, se lavaron y secaron a temperatura ambiente durante 24 horas y en estufa de circulación de aire forzado (Pro 3. Cuenca, Ecuador), a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 48 horas hasta obtener peso constante, para luego ser trituradas (Muñoz, 1987; World Health Organization, 1998). La obtención de los extractos lipofílicos de cada individuo se realizó mediante Flúidos Supercríticos (Waters®, USA), el solvente usado fue CO_2 grado alimenticio (Indura, Ecuador), como cosolvente 10% de etanol absoluto (MERCK, Darmstadt, Alemania), a una velocidad de flujo de 4,5 ml/min, 40°C y 100 bares de presión. Se programó en el software del equipo las siguientes condiciones: 4 min de duración dinámica y 2 min duración estática, durante 7 ciclos (de Melo, Silvestre, & Silva, 2014). El extracto recolectado se concentró y evaporó el exceso de solvente en un evaporador al vacío RapidVap (LABCONCO, USA) a 36°C y 500 mBar, hasta tener peso constante del extracto en los viales. Se conservaron los extractos a -20°C hasta su análisis.

2.5 Test de actividad antibacteriana

Se utilizó la técnica de microdilución en placa descrita por Eloff J. N. (1998) frente a la cepa ATCC BAA44 de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) con tres réplicas por extracto. La concentración del inóculo para el screening fue de 5×10^3 UFC/mL (Cos, Maes, Sindambiwe, Vlietinck, & Vanden Berghe, 2006).

El extracto lipofílico fue disuelto con Dimetilsulfóxido (DMSO) (Invitrogen, USA) y fue llevado a una concentración inicial de 20 mg/mL (solución stock), para luego ser diluido en la placa test con el medio nutriente caldo tripticasa soya (TSB) a concentraciones finales en la placa test de 64,0 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$, por medio de la preparación de placas intermedias de dilución con DMSO/agua. La proporción de DMSO no excedió al 1% en el medio. La solución de referencia fue ciprofloxacina (64 a 0,12 $\mu\text{g/mL}$) (Proflox, Siegfried). Se incubó durante 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La placa fue leída a 405 nm en un lector de microelisa (Biotek Elx800 Universal Microplate Readers, USA), para obtener la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Además con la finalidad de determinar la capacidad bactericida o bacteriostática del extracto, 100 μL de los pocillos que presentaron inhibición bacteriana fueron sembrados por duplicado en agar tripticasa soya (TSA), se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. La presencia de crecimiento bacteriano en las placas indicó una actividad bacteriostática del extracto y su ausencia una capacidad bactericida.

2.6 Test de actividad antifúngica

Se utilizó la técnica descrita por Cos et al. (2006), frente a la cepa ATCC 90028 de *Candida albicans* con tres réplicas por extracto. La concentración del inóculo para el screening fue de 10^4 UFC/mL.



El extracto lipofílico fue disuelto con DMSO (Invitrogen, USA) y fue llevado a una concentración inicial de 20 mg/mL (solución stock), para luego ser diluido en la placa test con el medio nutriente Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640 R8758, Sigma, USA), el cual fue usado con el buffer 3-morpholinepropanesulfonic acid 0,165 mol/L (MOPS- MW 209.26, Sigma, USA) ajustando el pH a 7 con NaOH 1N. Las concentraciones finales en la placa test fueron de 128, 32, 8, 2 y 0.5 µg/mL, a través de la preparación de placas intermedias de dilución con DMSO. La solución de referencia fue fluconazol (Diflucan, Pfizer). Se incubó durante 24 horas a 35°C±2°C. La placa fue leída a 405 nm en un lector de microelisa (Biotek Elx800 Universal Microplate Readers, USA), con la finalidad de obtener la CI50 (µg/mL) de cada extracto.

2.7 Análisis HPLC

Muestras de 5 mg de cada individuo de *H. laricifolium* fueron disueltas en 1 mL de la solución del disolvente compuesto por diclorometano/metanol, 10:90 (v/v). Se mezcló en un vortex. Se homogenizó durante 12 horas usando un homogenizador multiple (Labquake shaker rotisserie, Thermo Scientific, USA) y se mantuvo durante 20 min en un baño ultrasónico (Cole-parmer, USA). Un volumen de 100 µL del extracto fue diluido con 900 µL de metanol grado HPLC (Merck millipore, USA) para obtener una concentración final del extracto de 500 µg/mL. Finalmente la muestra fue filtrada con filtro de un diámetro de poro de 0,45 µm, y un volumen de 20 µL fue inyectado en el HPLC.

El análisis se llevó a cabo en un sistema Agilent 1200 HPLC Technologies (Agilent Technologies, USA) utilizando una columna monolítica C18 (100 × 4,6 mm, Merck Chromolitic® RP18E, Alemania) dispuesta en un horno a 40°C. Las fases móviles fueron constituidas por el solvente A, solución acuosa de 0,1% de ácido fosfórico (Merck); y solvente B, acetonitrilo puro (Merck). El gradiente fue el siguiente en la concentración del solvente B: 25 % de 0-5 min, 35 % hasta el minuto 25; 80 % hasta el minuto 45 y un 100% en los 5 minutos finales. La detección se lo realizó con un detector de arreglo de diodos (DAD) a 254, 280 y 360 nm. Todos los análisis fueron desarrollados por duplicado.

2.8 Análisis de datos

La actividad antimicrobiana fue evaluada y cuantificada según la CI50 de cada individuo (variable dependiente) y analizada frente a su altitud de muestreo correspondiente (variable independiente) mediante One Way ANOVA, con el fin de establecer si había diferencias significativas, en el *software SPSS Statistics 20*. Valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos (Massart et al., 1997).

Se realizó un test de regresión lineal múltiple entre los componentes del suelo (variables independientes) y los valores CI50 por individuo de la actividad antimicrobiana (variable dependiente), en donde todas las variables del suelo (pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, nutrientes totales de nitrógeno,



fósforo, potasio) en conjunto fueron introducidas en el análisis para construir el modelo de regresión. Adicionalmente se realizó un test de regresión lineal *stepwise*, en donde se introdujo una variable cada vez para la obtención del modelo final. Valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos (Massart et al., 1997). La interpretabilidad de los coeficientes β fueron los criterios considerados para la obtención del modelo (Gad, El-Ahmady, Abou-Shoer, & Al-Azizi, 2013). Se utilizó el *software SPSS Statistics 20*.

2.9 Análisis *fingerprint* cromatográfico y desarrollo de un modelo de la actividad antibacteriana

Los datos para el análisis *fingerprint* fueron obtenidos a partir del análisis cromatográfico HPLC, los cuales fueron exportados al software MATLAB 7.11.0.584 (R2010b) permitiendo obtener el perfil *fingerprint* para cada individuo (Tistaert et al., 2011).

Para el desarrollo del modelo predictivo de la actividad antibacteriana se creó una matriz de datos X , a partir de los datos obtenidos del análisis *fingerprint*, con una dimensión $n \times p$, siendo n el número de observaciones y p las variables (señales correspondientes en los diferentes tiempos de retención). La matriz y correspondió a los valores CI50 de cada individuo. Los datos fueron pre-tratados mediante centrado de la columna. Se obtuvo el modelo predictivo de la actividad mediante análisis PLS. Los coeficientes de regresión β , fueron usados para obtener la ecuación del modelo. Los coeficientes de correlación R^2 permitieron establecer la capacidad predictora del modelo obtenido (Liu et al., 2015; Otto, 2016; Tistaert et al., 2011).

En el Anexo 3, se visualiza de forma resumida la metodología utilizada en la investigación.

3. Resultados y Discusión

3.1 Individuos muestreados

Se obtuvieron 30 individuos de diferentes localidades de muestreo. Las altitudes correspondientes a cada individuo se encuentran en la Tabla 1.



Tabla 1. Información de muestreo de las 8 localidades en 3 provincias del Ecuador

Lugar de muestreo	Código individuo	Altitud (m.s.n.m.)
Vía a Aguarongo	O101C- O105C	3.165
Octavio Cordero	O206B-O207B	2.870
Nero 1	O308C-O310C	3.196
Nero 2	O412C	3.200
Vía Loja 1	O513D-O514D	3.416
Vía Loja 2	O615D-O617D	3.490
Vía Cañar	O718D-O727D	3.509
Loja	O828A-O831A	2.600

n=30

3.2 Componentes del suelo

En el Anexo 4, se presentan las concentraciones de los parámetros medidos de la composición del suelo (pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, nutrientes totales de nitrógeno, fósforo, potasio), para cada individuo muestreado. El pH del suelo fue ácido, su rango estuvo entre 4,2 - 6,4; la conductividad eléctrica presentó una variación mínima entre muestras siendo su promedio de 0,13 δ S/m; para la materia orgánica se observó una notable diferencia entre individuos 1,1– 37,68%, al igual que para las concentraciones de nitrógeno (2,87 – 183,48 ppm), fósforo (0,30 - 136,18 ppm), calcio (3,21 – 22,5 meq/100mL), magnesio (0,58 – 7,21 meq/100mL) y potasio (0,11 – 1,0 meq/100mL).

3.3 Clasificación taxonómica

Se obtuvieron los amplicones esperados para los tres *loci* (Figura 1). Los resultados de la secuenciación se encuentran en el Anexo 5, 6 y 7. El *loci rbcL* mostró una coincidencia en el género *Hypericum*, mas no en la especie, con una identidad del 98,8%, con código de acceso GQ436683, lo cual es posible debido a que no se han encontrado reportes en las bases de datos con el gen *rbcL* para ésta especie, permitiendo así que las secuencias obtenidas puedan alimentar la base de datos para la especie *laricifolium*, considerando además que los individuos investigados ya tenían previa identificación taxonómica como *H. laricifolium* y que el porcentaje de identidad de la planta para los *loci* ITS1 e ITS2 fue del 100% y 99,7% respectivamente, en la base de datos GenBank y del software Genious. Encontrándose la accesión con código HG004716.1, concluyendo de este modo que en cada localidad de muestreo se obtuvo la especie *H. laricifolium* Juss (información corroborada también al obtener el *fingerprint* de cada individuo). Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Nürk, Scheriau, & Madriñán (2013), en donde se investigaron los patrones filogenéticos del género *Hypericum*, entre ellos *H. laricifolium*.

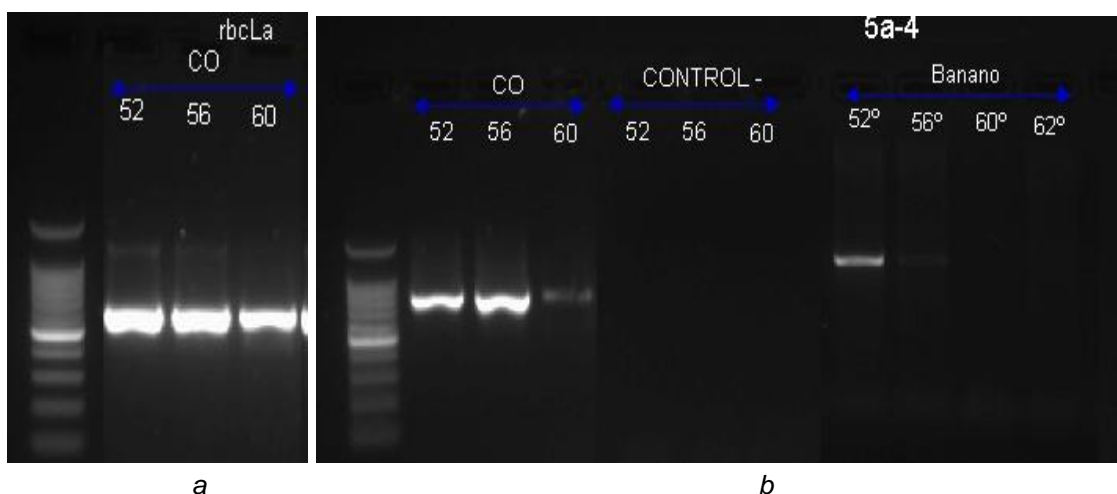


Figura 1. (a) Amplicon generado del loci *rbcL* (banda esperada 600 pb); (b) Amplicon generado del loci *ITS1* (banda esperada 707 pb; obtenido del tejido foliar de *H. laricifolium*).

3.4 Evaluación de la actividad antibacteriana

Se obtuvieron distintas CI50 para cada individuo de *H. laricifolium*. Es importante considerar esta variación, ya que a pesar de haberse evaluado el efecto antibacteriano con la misma especie de planta, se obtuvieron para cada extracto concentraciones inhibitorias diferentes contra SARM. La acción antibacteriana de todos los extractos fue bacteriostática, Figura 2.

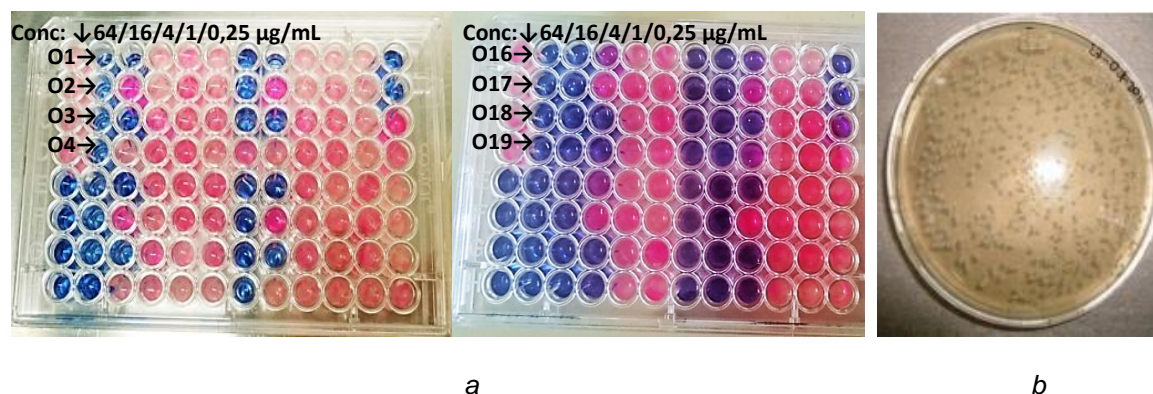


Figura 2. (a) Microdilución en placa de extractos de *H. laricifolium*, 5 concentraciones de 68-0,25 ug/mL, después de 24 h de incubación; (b) Determinación de la actividad bactericida o bacteriostática de las concentraciones inhibitorias de SARM-Medio TSA.

Las CI50 se presentan en la Tabla 2, en un rango de 0,8017 - 6,7382 $\mu\text{g/mL}$, considerándose de este modo como extractos muy activos, ya que si la CI50 es $< 5 \mu\text{g/mL}$ el compuesto es muy activo, si se encuentra entre 5 – 30 $\mu\text{g/mL}$ es ligeramente activo y si es $> 30 \mu\text{g/mL}$ no tiene actividad (Jerves et al., 2014). La presencia de la actividad antibacteriana de *H. laricifolium* en esta investigación coincide con los resultados obtenidos por Bussmann et al. (2010) al encontrar inhibición de sus extractos alcohólicos frente a *S. aureus*



Tabla 2. CI50 determinados para *H. laricifolium*

Código individuo	Act. antibacteriana CI50 (ug/mL)	Código individuo	Act. antibacteriana CI50 (ug/mL)
O101C	1,48369275	O617D	5,5206274
O102C	1,18622471	O718D	0,80172041
O103C	2,00640012	O719D	0,86142584
O104C	1,72660404	O720D	1,4765427
O105C	2,15885596	O721D	2,00640012
O206B	3,13683802	O722D	1,43566783
O207B	3,85291603	O723D	2,06461819
O308C	2,20780386	O724D	1,75221124
O309C	1,58121456	O725D	2,07434041
O310C	2,48351109	O726D	1,67566576
O412C	1,38855145	O727D	2,3922026
O513D	1,59151545	O828A	2,04520612
O514D	1,58059625	O829A	6,738220571
O615D	4,26210538	O830A	1,94203049
O616D	1,68852632	O831A	2,20780386

Los valores son presentados por individuo. n=30.

3.5 Evaluación de la actividad antifúngica

Las dosis de 128, 32, y 8 $\mu\text{g/mL}$ no presentaron inhibición de las cepas de *C. albicans*, sin embargo las dosis de 2 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ inhibieron más del 70% de las cepas en los pocillos. Estos resultados inusuales se debieron posiblemente a una alta concentración de DMSO en las diluciones previas de las muestras, ya que éste diluyente pudo haber actuado como un antifúngico durante la incubación de la cepa con el medio de cultivo en la placa, o también se presume que pudo ser un efecto del medio de cultivo utilizado, RPMI 1640 con bicarbonato de sodio en su formulación (único en stock), ya que se prefiere la ausencia de este compuesto en el medio de cultivo, para evitar posibles interferencias durante la prueba. Concluyendo así que los resultados obtenidos no brindaban la confiabilidad necesaria para el análisis de datos subsiguiente, por lo que la evaluación de las variables altitud y composición de suelo se realizó únicamente con las CI50 obtenidas de la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *H. laricifolium*.

3.6 Actividad antibacteriana y altitud

La CI50 de cada individuo fue evaluada frente a su altitud de muestreo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$). Se formaron 4 grupos de individuos con altitudes similares (2596, 2870, 3165-3200 y 3416-3509



m.s.n.m.), para así establecer si existían diferencias significativas entre los grupos de individuos y la CI50 correspondientes, y tampoco se encontró significancia ($p>0,05$). Por lo que se concluye que, en este estudio no existe influencia de la altitud sobre la actividad antibacteriana. Se debe considerar que el número de individuos que se pudo muestrear fue pequeño y hubo poca diferencia altitudinal entre ellos.

No obstante, se sugiere la existencia de otros factores que influyen sobre la actividad antibacteriana evaluada, como la diferente composición del suelo en donde se desarrollaron las especies de *H. laricifolium*.

3.7 Actividad antibacteriana y composición del suelo

El test de regresión lineal múltiple mostró significancia para la materia orgánica y el fósforo con valores $p=0,035$ y $p=0,034$ respectivamente. El análisis de regresión *stepwise*, reveló la influencia de la materia orgánica y el pH ($p=0,028$ y $p=0,001$ respectivamente). Concluyendo así, que la actividad antibacteriana y por lo tanto el contenido de ingredientes activos está fuertemente relacionado con la fertilidad del suelo (Lu, Sui, & Sun, 2006).

Así la materia orgánica ($\beta=-0,024$) junto con el pH ($\beta=-0,846$) fueron considerados los factores que influenciaron sobre la actividad antibacteriana evaluada, indicando además una correlación negativa (coeficientes β) con la CI50. Los resultados del modelo final permiten predecir la CI50, a partir de las concentraciones de materia orgánica y los valores de pH, de acuerdo con la ecuación 1.

$$CI50 = 6,638 - 0,846 (pH) - 0,024 (materia\ orgánica\ \%) \quad \text{Ecuación (1)}$$

En consecuencia las muestras que presentaron las concentraciones más altas de materia orgánica al igual que los valores más altos de pH, utilizaron menores CI50s, y por consiguiente sus extractos mostraron la mejor actividad antibacteriana.

Liu et al., (2015) encontraron que para los ingredientes activos de *S. hexandrum*, la relación de canferol y quercetina fue significativa y directamente proporcional con la materia orgánica; además de demostrar que los factores ecológicos tienen una importante influencia sobre el contenido de ingredientes activos, en donde los factores ambientales (promedio de precipitación anual-correlación negativa, pH del suelo y materia orgánica-correlación positiva y la disponibilidad de potasio) explicaron el 98,13% del total de variaciones geográficas en el contenido de los ingredientes activos.

La relación encontrada entre la actividad antibacteriana y el pH, se debe a que el pH es considerado uno de los principales factores para el mantenimiento de todos los organismos vivos, además de ser un factor ambiental crítico para el crecimiento de las plantas, debido a la fuerte influencia sobre la

disponibilidad de nutrientes, formando parte de complejas reacciones químicas, en donde las cinéticas de las reacciones desarrolladas en el suelo son influenciadas por el pH y tienen un alto impacto en la actividad microbiana que catalizan estas reacciones, considerando así a la materia orgánica como una importante fuente de electrones en el suelo, expresando de este modo que existe una relación del pH sobre la materia orgánica (Husson, 2013).

La biota del suelo incluyendo los microorganismos, a través de sus productos de deshecho contribuyen a la formación de la materia orgánica en el suelo (FAO, 2015). Desde el punto de vista de la ecología y dinámica de los suelos es importante señalar que tanto la velocidad de adición como la de descomposición de materia orgánica, cambian conforme las condiciones ambientales y de uso del suelo. Tal es el caso de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, como la lignina y los flavonoides que pueden provenir de la presencia de sustancias aromáticas presentes en la materia orgánica del suelo, al igual que de la síntesis por microorganismos de compuestos de carbono no aromáticos (Paneque, 1978). Por lo que la materia orgánica (incluyendo la comunidad bacteriana) y el pH influyen en la síntesis de metabolitos específicos en las plantas (Cheynier, Comte, Davies, Lattanzio, & Martens, 2013; Liu et al., 2015).

3.8 *Fingerprint cromatográfico de H. laricifolium*

Los cromatogramas obtenidos (Figura 3) se analizaron para identificar todas las señales cromatográficas obtenidas en los diferentes tiempos de retención y para cada espectro de absorción (254, 280 y 360 nm).

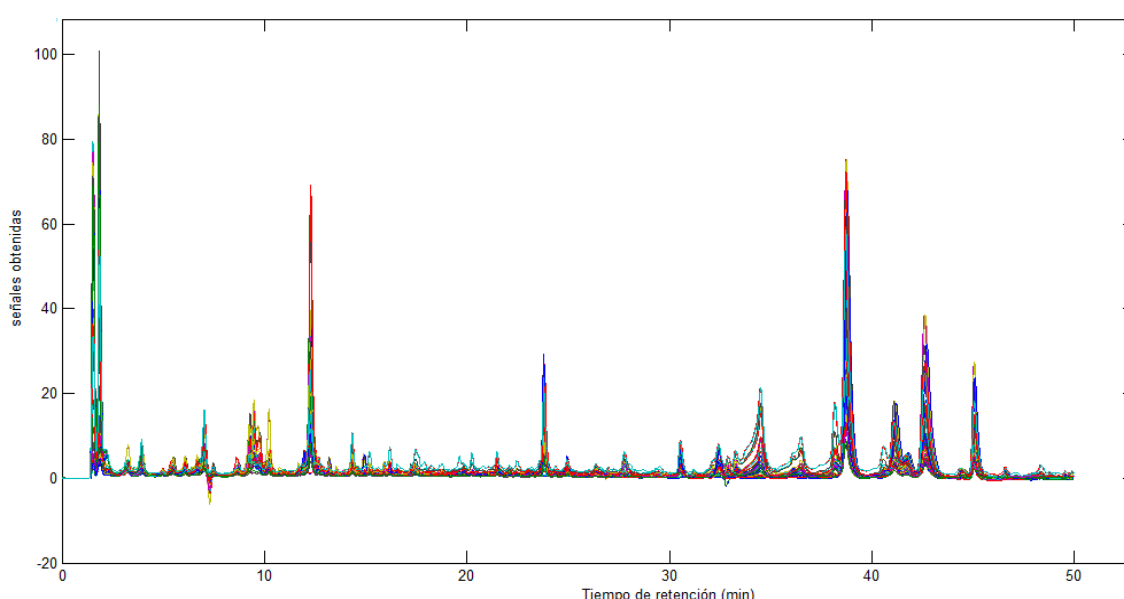


Figura 3. Señales fingerprint obtenidas de cada muestra en el análisis HPLC



Se obtuvo de este modo, una matriz de datos a partir de la información de los *fingerprint* herbales de cada individuo, la cual fue organizada en una matriz de datos X con dimensión $n \times p$, en donde n fue el número de observaciones (*fingerprint* por individuo y sus réplicas) y p las variables (respuestas en los diferentes tiempos de retención). La matriz y correspondió a las concentraciones de la actividad antibacteriana IC50.

En la calibración multivariada realizada, un modelo cuantitativo fue desarrollado para la predicción de la actividad antibacteriana, partiendo de un número de variables predictoras (x_1, x_2, \dots, x_n) proveniente de puntos o variables de una fuente cromatográfica HPLC (respuestas los tiempos de retención). El modelo servirá como base para predecir el valor de la propiedad antibacteriana en muestras futuras (Dejaegher, Tistaert, Dumarey, Alaerts, & Vander Heyden, 2010; Gad et al., 2013; Tistaert et al., 2011; Vander Heyden et al., 2013).

Se realizó el pre-tratamiento de datos mediante *column centering*. Con el análisis PLS se crearon variables latentes en base a la covarianza maximizada entre la matriz de datos X y el vector de respuesta y . Por lo tanto, para modelar la relación entre la capacidad antibacteriana y los datos cromatográficos de los extractos de *H. laricifolium*, la matriz de calibración X (60x7501) consistió de 30 muestras con sus respectivas réplicas, con 7501 variables correspondientes a las respuestas obtenidas en los diferentes tiempos de retención hasta el minuto 50. La variable " y " consistió de la concentración de actividad antibacteriana de cada extracto, expresada como CI50. Para evitar sobreajustes del modelo, se empleó la técnica de validación cruzada para construir los modelos PLS en la que una muestra se remueve del set de calibración, y el modelo de PLS se calibra con los datos restantes (Leave-one-out *cross-validation*, *LOOCV*). El modelo de PLS fue validado por *cross-validation*, su capacidad predictiva fue evaluada usando el coeficiente de correlación R^2 .

Al comparar los valores de actividad antibacteriana medida frente a la predicha, se obtuvo un valor del coeficiente de correlación bajo, para 254nm ($R^2 = 0,7115$), 280 nm ($R^2 = 0,5452$) y 360 nm ($R^2 = 0,6915$). Este resultado se puede explicar debido, a la presencia de valores atípicos u *outliers*. En este caso, una actividad antibacteriana de 6,73 $\mu\text{g/mL}$, con los valores más bajos de materia orgánica (2,95%) y pH (4,2) en la muestra O829A_2 y su réplica, lo cual permitió identificarla como un elemento distante del resto de datos de CI50. Su eliminación (de cada longitud de onda analizada) mejoró evidentemente la capacidad predictiva del modelo.

Por lo que el modelo de predicción final constó de 29 individuos más sus réplicas, una matriz de datos X (58x7501). En la Figura 4, se puede observar la correlación entre los valores de CI50 observados y los CI50 predichos.

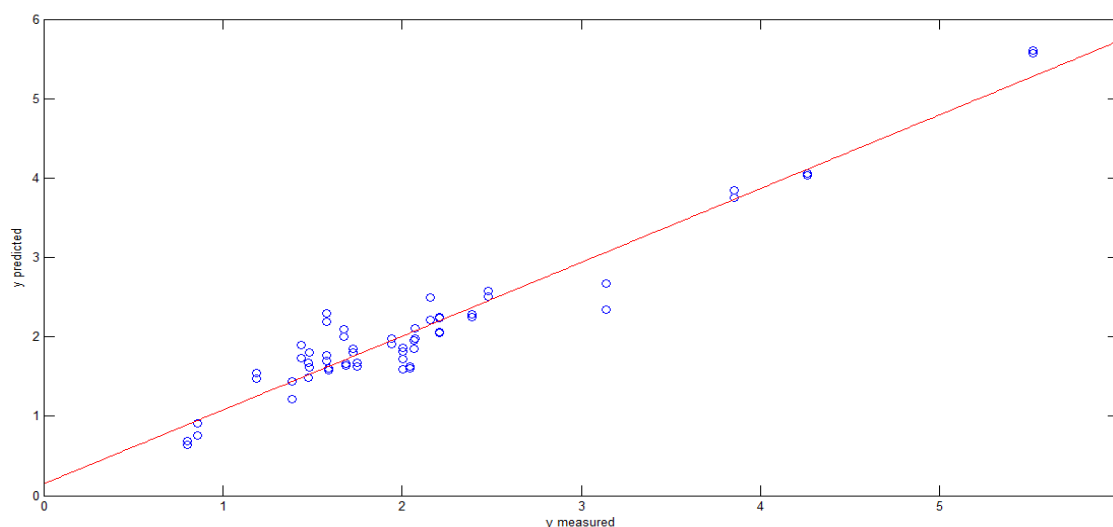


Figura 4. Correlación entre la actividad antibacteriana predictiva y experimental de las muestras usadas para la calibración del modelo a 254 nm

El modelo de calibración viene dado por la ecuación (2).

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i \quad \text{Ecuación (2)}$$

Dónde:

\hat{y} = actividad predictiva

β_0 = intercepto

β_i = coeficientes de los predictores

n = número de observaciones

X = variable predictora original

Los coeficientes de regresión b_i fueron usados para evaluar la contribución de las variables originales al modelo final y para predecir los valores de actividad antibacteriana en nuevas muestras de *H. laricifolium*.

Los coeficientes de correlación obtenidos para el modelo final se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados comparativos de los coeficientes de correlación en los modelos de predicción a 254, 280 y 360 nm

Espectro	R^2
254 nm	0,9297
280 nm	0,4783
360 nm	0,8059

El número óptimo de componentes principales fue de cinco, ya que con estos componentes se presentó el menor valor para RMSECV (Figura 5).

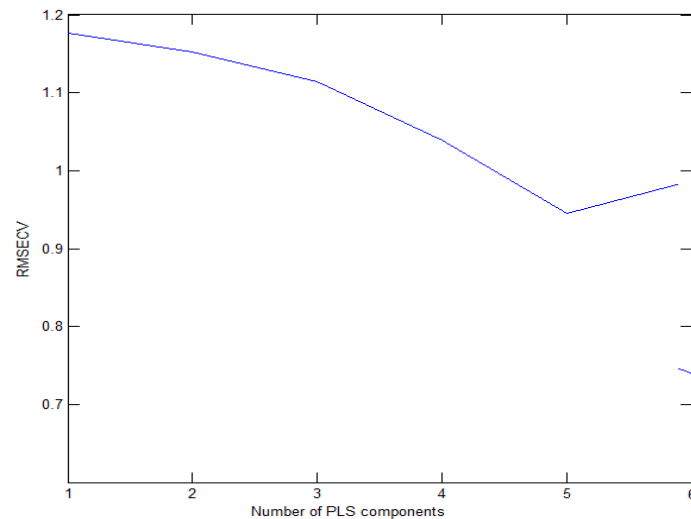
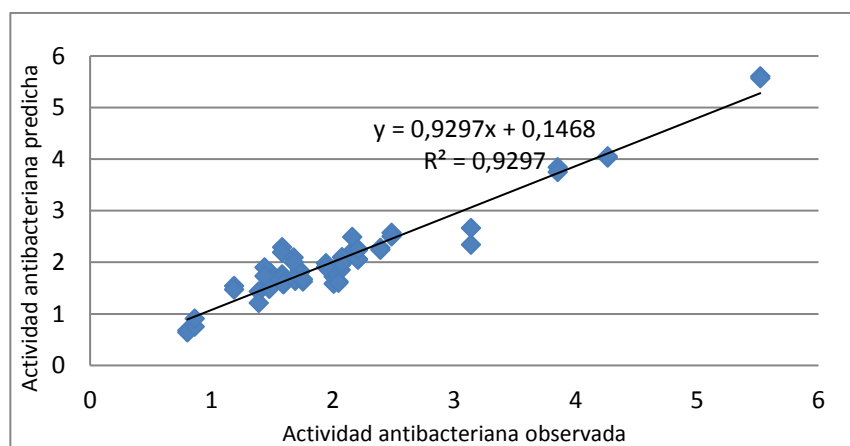
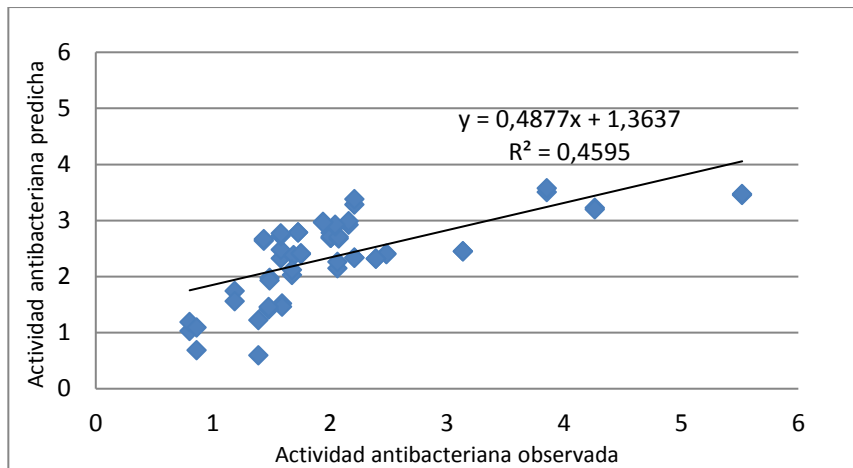


Figura 5. Número de componentes principales en función del RMSECV

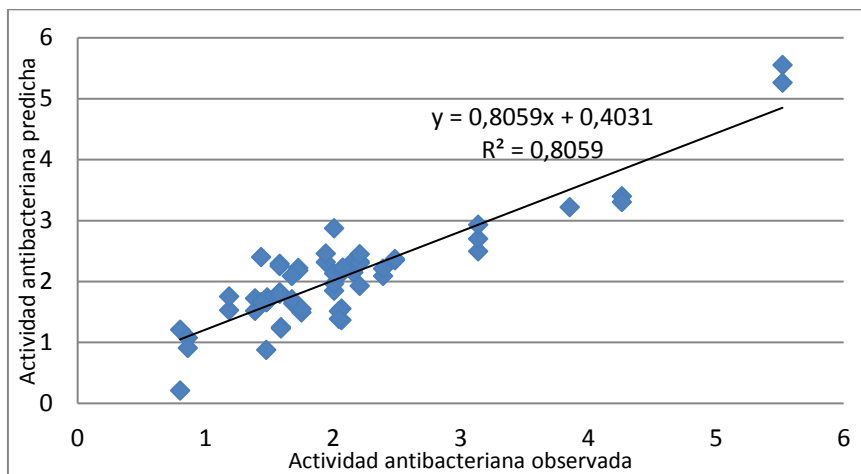
Se concluye que para estimar la mejor capacidad antibacteriana, la longitud de onda 254 nm presentó el mejor valor de R^2 , donde el ajuste del modelo fue del 92%, 46% para 280 nm y 81% para 360 nm (Figura 7).



a



b



c

Figura 6. Resultados de los modelos en sus respectivas regresiones (a) 254 nm; (b) 280 nm; (c) 360 nm

4. Conclusiones

La actividad antibacteriana de los extractos lipofílicos de *H. laricifolium* fue influenciada por los componentes del suelo pH y materia orgánica, más en este estudio no se encontró una relación entre la altitud y el efecto antibacteriano. Por lo que, se concluye que al igual que en otras investigaciones ciertas condiciones ambientales producen situaciones de estrés sobre las plantas, afectando de este modo su metabolismo secundario y por lo tanto su actividad biológica.

El perfil cromatográfico *fingerprint* de *H. laricifolium* Juss, posibilitó el desarrollo de un modelo base de predicción de la actividad antibacteriana, que permitirá determinar ésta actividad en nuevas muestras de *H. laricifolium*, por medio de la obtención de sus datos cromatográficos mediante HPLC.



Agradecimientos

La investigación se realizó en el marco del programa para la Cooperación Universitaria entre la Universidad de Cuenca, Ecuador y el conjunto de postgrados VLIR NETWORK Ecuador de Bélgica, con la colaboración del proyecto de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.



Referencias

- Bansal, A., Chhabra, V., Rawal, R. K., & Sharma, S. (2014). Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(4), 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.12.001>
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., ... Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>
- Ccana-Ccapatinta, G. V., Barros, F. M. C. de, Bridi, H., & Poser, G. L. von. (2015). Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections Brathys and Trigynobrathys. *Phytochemistry Reviews*, 14(1), 25-50. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9332-2>
- Ccana-Ccapatinta, G. V., & von Poser, G. L. (2015). Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum laricifolium* Juss. *Phytochemistry Letters*, 12, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.014>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *Plos One*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>



Cos, P., Maes, L., Sindambiwe, J.-B., Vlietinck, A., & Vanden Berghe, D. (2006).

Bioassays for antibacterial and antifungal activities. En *Biological Screening of Plant Constituents*. Italia: ICS-UNIDO.

Costa, J., Campos, B., Amaral, J. S., Nunes, M. E., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I.

(2016). HRM analysis targeting ITS1 and matK loci as potential DNA mini-barcode for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control*, 61, 105-114.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.035>

Cuadra, P., Harborne, J. B., & Waterman, P. G. (1997). Increases in surface flavonols

and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 45(7), 1377-1383. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00183-0)

de Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., & Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid

extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>

Dejaegher, B., Tistaert, C., Dumarey, M., Alaerts, G., & Vander Heyden, Y. (2010).

Chromatographic herbal fingerprints: Development, Validation, and Data Handling. Oral Pres. on Invitation, Brussels, Belgium. Recuperado a partir de [difusion.ulb.ac.be/vufind/Record/ULB-](https://difusion.ulb.ac.be/vufind/Record/ULB-DIPOT:oai:dipot.ulb.ac.be:2013/191989/Details)

[DIPOT:oai:dipot.ulb.ac.be:2013/191989/Details](https://difusion.ulb.ac.be/vufind/Record/ULB-DIPOT:oai:dipot.ulb.ac.be:2013/191989/Details)

Dong, J., Ma, X., Wei, Q., Peng, S., & Zhang, S. (2011). Effects of growing location on

the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior



- clones of *Eucommia ulmoides*. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1607-1614. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.007>
- Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical bulletin*, 19, 11-15.
- Elif, U., Ahmet, M., Aydan, K., Ahmet, C., Meryem, Ş., & Ali, Y. (2008). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plants Used as Remedies in Turkish Traditional Medicine, *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 207-224. <https://doi.org/10.1080/13880200701735577>
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, *Planta medica*, 64, 711-713.
- FAO. (2009). *Guía para la descripción de suelos* (Cuarta edición). Roma.
- FAO. (2015). Materia orgánica y actividad biológica. Recuperado 20 de abril de 2017, a partir de http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/ba/organic_matter.pdf
- Fobofou, S. A. T., Franke, K., Sanna, G., Porzel, A., Bullita, E., La Colla, P., & Wessjohann, L. A. (2015). Isolation and anticancer, anthelmintic, and antiviral (HIV) activity of acylphloroglucinols, and regioselective synthesis of empetrifranzinans from *Hypericum roeperianum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(19), 6327-6334. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.028>
- Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Abou-Shoer, M. I., & Al-Azizi, M. M. (2013). A Modern Approach to the Authentication and Quality Assessment of Thyme Using UV Spectroscopy and Chemometric Analysis: Quality Control of Thyme



- Using UV Spectroscopy and Chemometrics. *Phytochemical Analysis*, 24(6), 520-526. <https://doi.org/10.1002/pca.2426>
- Husson, O. (2013). Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant and Soil*, 362(1-2), 389-417. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>
- Jerves, L., León, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., ... Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential, *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(45), 1310-1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Kumar, N., Kumar, S., & Ahuja, P. S. (2005). Photosynthetic characteristics of Hordeum, Triticum, Rumex, and Trifolium species at contrasting altitudes. *Photosynthetica*, 43(2), 195-201. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0033-y>
- Liu, W., Liu, J., Yin, D., & Zhao, X. (2015). Influence of Ecological Factors on the Production of Active Substances in the Anti-Cancer Plant Sinopodophyllum hexandrum (Royle) T.S. Ying, *Plos one*, 10(4), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122981>
- Lu, S., Sui, X., & Sun, Q. (2006). Biological functions of secondary metabolites of medicinal plants and influences of ecological environment., *Natural Product Research and Development*, 18(6), 1027.
- Manzano, P. I., Miranda, M., Gutiérrez, Y., Santos, E., & Scull, R. (2014). Estudio morfo-anatómico e identificación genética de Vernonthura patens (Kunth) H. Rob. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2(5), 119-128.



- Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P., & Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Muñoz, F. (1987). *Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Nürk, N. M., Scheriau, C., & Madriñán, S. (2013). Explosive radiation in high Andean *Hypericum*—rates of diversification among New World lineages. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00175>
- Otto, M. (2016). *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Paneque, G. (1978). *Materia orgánica del suelo: química, morfología y biología*. Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- Purty, R., & Chatterjee, S. (2016). DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy, *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 3(1), 1-10.
- Ruiz, J., & Huamaní, M. (2005). *Determinación de la actividad antifúngica contra Candida Albicans y Aspergillus Niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú* (para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Saroglou, V., Petar, M., Rancic, A., Veljic, M., & Skaltsa, H. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia, *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 146-152.
- Tistaert, C., Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2011). Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review.



Analytica Chemical Acta, 690, 148-161.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.023>

Tongco, M. D. C. (2007). Purposive sampling as a tool for informant selection.

Ethnobotany Research & Applications. 5, 147-158.

Vander Heyden, Y., Alaerts, G., Goodarzi, M., Tistaert, C., Viaene, J., & Dejaegher, B.

(2013). *Herbal fingerprints: development and extraction of information*.

Presentado en AFERP & STOLON International Symposium, Brussels

(Belgium).

Wilson, K. E., Wilson, M. I., & Greenberg, B. M. (1998). Identification of the

Flavonoid Glycosides that Accumulate in *Brassica napus* L. cv. Topas

Specifically in Response to Ultraviolet B Radiation. *Photochemistry and*

Photobiology, 67(5), 547-553. <https://doi.org/10.1111/j.1751->

1097.1998.tb09092.x

World Health Organization. (1998). *Quality control methods for herbal materials*.

Recuperado a partir de

<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>

Yang, L., Wu, D., Tang, X., Peng, W., Wang, X., Ma, Y., & Su, W. (2005). Fingerprint

quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-

photodiode array detection., *Journal of Chromatography A*, 1070(1-2), 35-42.

Zhou, Z., Zhang, Y., Pan, K., Luo, J., & Kong, L. (2014). Cytotoxic polycyclic

polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum*, *Fitoterapia*,

95, 1-7.



Zidorn, C., & Stuppner, H. (2001). Evaluation of Chemosystematic Characters in the Genus *Leontodon* (Asteraceae), *Taxon*, 50(1), 115-133.

<https://doi.org/10.2307/1224515>

Zobayed, S. M. A., Afreen, F., & Kozai, T. (2005). Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(10-11), 977-984.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.013>



ANEXOS

ANEXO 1

Metodología para la identificación molecular barcode

Extracción de ADN de *Hypericum laricifolium*.

- Seleccionar el tejido foliar
- Pulverizar tejido foliar con nitrógeno líquido
- Extracción de ADN - Método CTAB
 - Lisis:
 - Buffer de extracción (CTAB, NaCl, EDTA, Tris- HCL, PVP, B-mercaptoetanol, ddH₂O)
 - ADN + Buffer (150 mg + 800 µL)
 - Proteinasa K (15 µL)
 - Baño María, 60 min
 - Purificación
 - Cloroformo-isoamil (700 µL)
 - Centrifugar (14.000 rpm/4°C/10 min) - sobrenadante
 - RNAsa (6 µL)/15 min/37°C
 - Cloroformo-isoamil (1V)
 - Centrifugar (14.000 rpm/4°C/10 min) – sobrenadante
 - Precipitación
 - Isopropanol (1V), -20°C/30 min
 - Centrifugar (14.000 rpm/4 °C/20 min) – sobrenadante
 - Lavar pellet con etanol (200 µL)
 - Centrifugar
 - Secar (temperatura ambiente)
 - Resuspensión (Agua libre de nucleasas)
 - Purificación (Kit comercial)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Mix: Go taq, primers *rbcL*, *5a4*, *S2S3* (F/R), ddH₂O
- Mezclar Mix 8 µL + ADN 2 µL
- Centrifugar (7"/14.000 rpm)

Electroforesis

- Gel agarosa 1.8 %, Buffer TAE 1X
- Sol. Loading 1 µL + ADN 5 µL
- 10 µL muestra, 30 min, Marcador 100 pb
- Visualizar imagen – verificar presencia de bandas esperadas
- Preparar el PCR con 50 µL de ADN

Secuenciar

Verificar los resultados de la secuenciación en una base de datos.



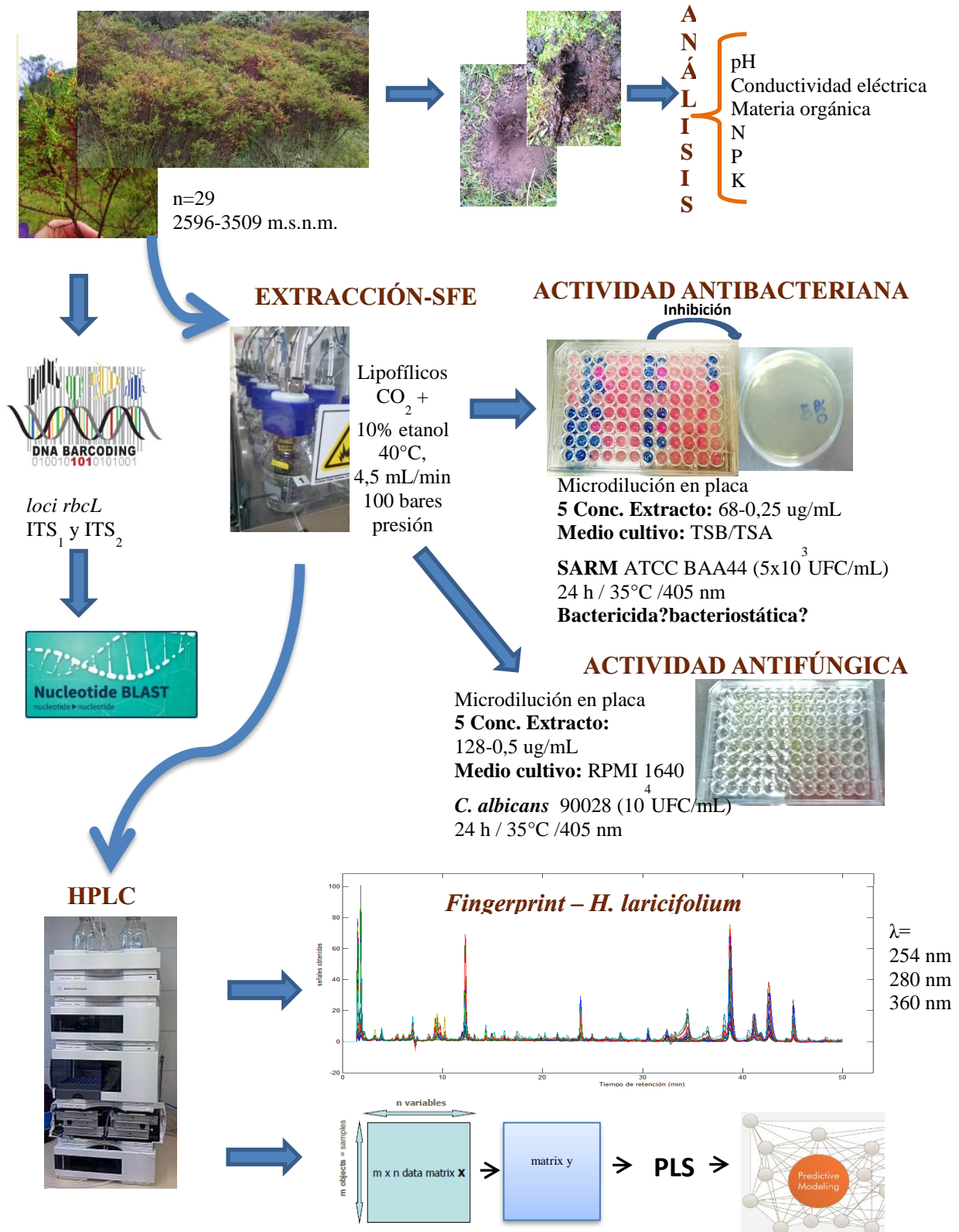
ANEXO 2

Secuencias de los primers utilizados en el análisis molecular

Marcador	Nombre del primers	Secuencias de los primers 5'-3'
ITS1	5a fwd	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG
	4 rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS2	S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
	S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa_F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
	<i>rbcLa_R</i>	GTAAAATCAAGTCCACCRCG

ANEXO 3

Metodología para la evaluación de las variables altitud y composición de suelo sobre la actividad antimicrobiana de *H. laricifolium* y proceso utilizado para la obtención del *fingerprint* y el modelo predictivo.



ANEXO 4

Concentraciones de los componentes de los suelos analizados por individuo muestreado
(*H. laricifolium*)

Muestras	pH	C.E. (δ S/m)	M.O. (%)	N (ppm)	P (ppm)	K (meq/100mL)	Ca (meq/100mL)	Mg (meq/100mL)
O101C	4,8	0,04	26,50	43,15	6,60	0,25	5,07	0,91
O102C	4,8	0,04	26,50	43,15	6,60	0,25	5,07	0,91
O103C	4,9	0,15	37,68	135,13	4,63	0,12	9,58	1,53
O104C	4,9	0,15	37,68	135,13	4,63	0,12	9,58	1,53
O105C	4,6	0,12	35,82	183,48	9,28	0,11	7,17	0,87
O206B	5,2	0,07	1,10	5,48	5,68	0,48	18,25	5,34
O207B	5,2	0,07	1,1	5,48	5,68	0,48	18,25	5,34
O308C	4,8	0,08	36,89	72,72	88,55	0,25	3,21	0,58
O309C	4,9	0,07	25,77	35,26	58,99	0,56	3,91	0,66
O310C	4,9	0,07	25,77	35,26	58,99	0,56	3,91	0,66
O412C	4,9	0,07	25,77	35,26	58,99	0,56	3,91	0,66
O513D	6,4	0,33	3,57	2,87	57,34	0,66	20,98	1,45
O514D	6,4	0,33	3,57	2,87	57,34	0,66	20,98	1,45
O615D	4,2	0,05	14,6	44,38	80	0,6	4,28	1,03
O616D	4,2	0,05	14,6	44,38	80	0,6	4,28	1,03
O617D	4,2	0,18	8,57	30,2	136,18	0,8	7,99	2,63
O718D	5,7	0,26	7,94	9,64	15,76	0,63	22,01	3,05
O719D	5,8	0,31	7,85	11,02	7,39	1,00	22,50	3,12
O720D	5,3	0,26	6,26	5,15	5,78	0,70	22,18	3,01
O721D	5,3	0,26	6,26	5,15	5,78	0,70	22,18	3,01
O722D	5,2	0,12	8,20	4,81	0,30	0,73	19,35	3,90
O723D	5,2	0,12	8,20	4,81	0,30	0,73	19,35	3,90
O724D	5,4	0,13	2,51	2,73	8,67	0,30	21,89	3,62
O725D	5,4	0,13	2,51	2,73	8,67	0,30	21,89	3,62
O726D	5,1	0,13	14,45	31,40	2,24	0,26	9,99	2,54
O727D	5,1	0,13	14,45	31,40	2,24	0,26	9,99	2,54
O828A	4,2	0,06	2,95	39,31	6,03	0,33	3,37	0,72
O829A	4,2	0,06	2,95	39,31	6,03	0,33	3,37	0,72
O830A	4,5	0,04	4,35	9,06	15,54	0,48	3,55	2,52
O831A	4,5	0,03	2,74	17,17	4,39	0,34	3,97	7,21

Los valores son presentados por parámetro analizado y por cada individuo. n=30. C.E., Conductividad Eléctrica; M.O., Materia Orgánica; N, Nitrógeno total; P, Fósforo; K, Potasio; Ca, Calcio; Mg, Magnesio.



ANEXO 5

Secuencias resultados de la amplificación del *loci rbcL* del primer forward y reverse-formato FASTA

```
>160915-02_K07_46_rbcLa_F.ab1      578
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCGTTAAGAGTATAAATTGACTTATTATAC
TCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTTAGAGTAA
CTCCTCAACCTGGGGTTCCCCCGGAGGAAGCAGGAGCAGCGGTAGCTGCG
GAATCTTCTACTGGTACCTGGACAACGTGTCTGGACGGATGGATTGACAAG
TCTTGATCGTTATAAAGGACGATGCTACCACATTGAGCCTGTTCTCTGGAG
AGGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAA
GAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGG
ATTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGCTTGGAGGATTTGCGAATCCCGCCTG
CTTATTTCGAAAACCTTTCCAAGGTCCGCCCATGGGATCCAAGTTGAAAGA
GATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCTATTAGGTTGTACGATTNNNCC
TANNTTGNNNNNNCCCGCNNNGAAGTCAGCTCTNNNNNGNNTNNTNAGTNN
NCGTCAAAAAAATNNTTCGNNTTNANAN
>160915-02_C13_66_rbcLa_R.ab1      143
NNNNNNNNNNNNNNNCGACGNNNTCTNAGCGGANAACCCCNATTTAGGTTTA
ATAGTACAACCTAATAGGGGACGGCCATACTTGTTCATTTATCTCTTTC
AACTTGGATCCCATGGGGCGGACCTTGGAAGTTTTTCGAATAA

>160915-02_M07_47_rbcLa_F.ab1      130
ANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGTTAAGAGTANAAATTGACTTATTATACTC
CTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTTAGAGTAACT
CCTCAACCTGGGGTTCCCCCGGAGGAAGCA
>160915-02_E13_67_rbcLa_R.ab1      145
NNNNNNNNNNNNNNNCGANNNNNNTCTNAGCGGANAACCCCNATTTAGGTT
TAATAGTACAACCTAATAGGGGACGGCCATACTTGTTCATTTATCTCTT
TCAACTTGGATCCCATGGGGCGGACCTTGGAAGTTTTTCGAATAA

>160915-02_O07_48_rbcLa_F.ab1      128
NNNNNNNNNNNNNNNGNNGGCGTTAAGAGTANAAATTGACTTATTATACTC
CTGACTATGAAACCAAAGATACTGNTATCTTGGCAGCATTTAGAGTAACT
CCTCAACCTGGGGTTCCCCCGGAGGNNN
>160915-02_G13_68_rbcLa_R.ab1      424
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGANAACCCCANNNNNNNNTTNA
NNAGTACAACCTAATAGGGGACGGCCATACTTGTTCATTTATCTCTTTC
AACTTGGATCCCATGGGGCGGACCTTGGAAGTTTTTCGAATAAGCAGGCG
GGATTTCGCAAATCCTCCAAGCGTAGAGCACGCAGGGCTTTGAATCCNAAT
ACATTTCTTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGAACCTTCTTCAA
AAGGTCTAAGGGGTAAGCTACATAACATATATATTGATTTCTCTCCAG
GAACAGGCTCAATGTGGTAGCATCGTCCTTTATAACGATCAAGACTTGTC
AATCCATCCGTCCAGACAGTTGTCCAGGTACCAGTAAAAGATTCCGCAGC
TACCGCTGCTCCTGCTTCTCTCCGG

>160915-02_A09_49_rbcLa_F.ab1      132
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGTTAAGAGTATAAATTGACTTATTATACT
CCTGNCTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTTAGAGTAAC
TCCTCAACCTGGGGTTCCCCCGGAGGAAGCAN
>160915-02_I13_69_rbcLa_R.ab1 438
NNNNNNNNNNNNNGANGNNNTCTTAGCGGANAACCCCAATTTAGGTTTAAT
AGTACAACCTAATAGGGGACGGCCATACTTGTTCATTTATCTCTTTCAA
CTTGGATCCCATGGGGCGGACCTTGGAAGTTTTTCGAATAAGCAGGCGGG
ATTTCGAAATCCTCCAAGCGTAGAGCACGCAGGGCTTTGAATCCAAATAC
ATTTCTTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGAACCTTCTTCAAAAA
```



GGTCTAAGGGGTAAGCTACATAACATATATATTGATTTTCCTCTCCAGGA
ACAGGCTCAATGTGGTANCATCGTCCTTTATAANNANCANNACTTGTCNA
TCCNTCCGTCCAGACNGTTGTCCAGGNACCANNANANATTCGCGANCTA
CCGNTGCTCCNGCTTCNCCNNNGANNNNNNNGNNNN

>160915-02_C09_50_rbcLa_F.ab1563

NNNNNNNNNNNNNNNGNNGCGTTAAGAGTATAAATTGACTTATTATACT
CCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTTAGAGTAAC
TCCTCAACCTGGGGTTCCCCCGGAGGAAGCAGGAGCAGCGGTAGCTGCGG
AATCTTCTACTGGTACCTGGACAACGTGTCTGGACGGATGGATTGACAAGT
CTTGATCGTTATAAAGGACGATGCTACCACATTGAGCCTGTTCTTGGAGA
GGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAG
AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGA
TTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGCTTGGAGGATTTGCNAATCCCGCCTGC
TTATTCNANNACTTTCCAAGGNCCGCNCCATGGGATCCAANTTGAANNAG
ANAANTTNANNNNTNTNNNCNCCCCCTATTANGTNGNACTATTNNNCCT
ANNTTGNNNNNANCNNNNNNNNNNNACNNNNNANNNNTTTANNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNTN

>160915-02_K13_70_rbcLa_R.ab1

148

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNANNNNNNNNGGANAACCCNNANNNNNNN
TTTAATAGTACAACTAATAGGGGGCGGCCATACTTGTTCAATTTATCTC
TTTCAACTTGATCCCATGGGGCGGACCTTGGAAGTTTTCGAATAAG

Primer *rbcLa_F*: *rbcLa* forward, *rbcLa_R*: *rbcLa* reverse. n=5



ANEXO 6

Secuencias resultados de la amplificación del *loci* ITS1 del primer forward y reverse-formato FASTA

```
>160915-02_E09_51_5a_fwd.ab1 678
NNNNNNNNNNNNNNNNNAGGTGANCTGCGGAGGANCATTGTCGAAACCTGCA
AATGACCCGCGAACTAGTTATCAACATGTTGGGAGAGATGGGAGAAATCC
CATAGCTTCTTCGTGCCAGTGGAGGGTAATTGTGTCGTTATAATGGCGGC
ATGATTATTTGACACTCGGACAACTAACCAACCCCGGCGCGGTATGCGC
CAAGGAACTTTGCATTAAATGTGGTTCGTGCCCACGATCGTTCCGTAAAAC
GGAAGAAGCGAACGTGATCTTGGCCACTTTTTTATTACACAAAACGACTC
TCGGCAACGGATATCTAGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG
CGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTC
ACACATCATCCCCACCGAACCAATAATTCATTGTCGTTGTTTGGTAAGA
GGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTGCATGCTCGCGGTTGNCCTANA
AANAAATTCCTGGNGATTGCNANCCATGACCANCGNNGGTTNANNNACCC
TCNATGGNTGNTGTNANANCTTNNNNNNNNNTNNNNNNNNNACNCNNNNNNN
NNNNNNNNNTTNTTNNNNNNNNNNNNNNNNN
>160915-02_M13_71_4_rev.ab1 248
NNNNNNNNNNNNNNNNNNGACTGGGGTCNCTTGAAGAGTGTTTGACATAAC
AAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCACA
CACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCACCA
GGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAANGCGCACGGGAGACCATTTT
CCGCCCATCCTCTTACCAACAACGACAATGAATTATTTGGTTCGGNG

>160915-02_G09_52_5a_fwd.ab1 432
NNNNNNNNNNNNNNNNNAGGTGANCTGCGGAGGANCATTGTCGAAACCTGCA
AATGACCCGCGAACTAGTTATCAACATGTTGGGAGAGATGGGAGAAATCC
CATAGCTTCTTCGTGCCAGTGGAGGGTAATTGTGTCGTTATAATGGCGGC
ATGATTATTTGACACTCGGACAACTAACCAACCCCGGCGCGGTATGCGC
CAAGGAACTTTGCATTAAATGTGGTTCGTGCCCACGATCGTTCCGTAAAAC
GGAAGAAGCGAACGTGATCTTGGCCACTTTTTTATTACACAAAACGACTC
TCGGNNACGGATATCTANGCTCTTGCATCGATGAANAACGTANNNAATG
CNATACTTGNNGGGAATTGCNNAATCCCNNGNCCNTCNNNNCNTTGAAC
GCNNGNNNNNCCCTNANCCNNNNGNNCNNNGN
>160915-02_O13_72_4_rev.ab1 220
NNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNGACTGGGGNCNCTTGAGAGTGTTTGACATAA
CAAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCACA
ACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCACC
AGGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAATGCGCACGGGAGACCATTT
TCGCCCATCCTCTTACCAA

>160915-02_I09_53_5a_fwd.ab1 639
NNNNNNNNNNNNNNNNNAGGTGANCTGCGGAGGANCATTGTCGAAACCTGC
AAATGACCCGCGAACTAGTTATCAACATGTTGGGAGAGATGGGAGAAATC
CCATAGCTTCTTCGTGCCAGTGGAGGGTAATTGTGTCGTTATAATGGCGG
CATGATTATTTGACACTCGGACAACTAACCAACCCCGGCGCGGTATGCG
CCAAGGAACTTTGCATTAAATGTGGTTCGTGCCCACGATCGTTCCGTAAAA
CGGAAGAAGCGAACGTGATCTTGGCCACTTTTTTATTACACAAAACGACT
CTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAAT
GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGTGT
CACACATCATCCCCACCGAACCAATAATTCATTGTCGTTGTTTGGTAAG
AGGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTGNCNTTGCTCGCGNTTGGCCTAN
NAANNNNNTTCNNNNNGANTGNNNNCCNTGANCANNNNNNNNTGAAANAN
```




NNTNNNNNGGNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

>160915-02_A15_73_4_rev.ab1 247

NNNNNNNNNNNNNNNNNGACTGGGGTCNCTTGAAGAGTGNTTGACATAA
CAAACACGTTCAAGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCACA
ACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCACC
AGGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAATGCGCACGGGAGACCATT
TCCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTCGG

>160915-02_K09_54_5a_fwd.ab1 634

NNNNNNNNNNNNNNNAGGTGACCTGCGGAGGANCATTGTGCGAAACCTGCAA
ATGACCCGCGAACTAGTTATCAACATGTTGGGAGAGATGGGAGAAATCCC
ATAGCTTCTTCGTGCCAGTGGAGGGTAATTGTGTCTGTTATAATGGCGGCA
TGATTATTTGACACTCGGACAACTAACCAACCCCGGCGCGGTATGCGCC
AAGGAACTTTGCATTAAATGTGGTCGTGCCACGATCGTTCGGTAAAACG
GAAGAAGCGAACGTGATCTTGGCCACTTTTTCATTACACAAAACGACTCT
CGGCAACGGATATCTAGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCGAAGCCTCCTGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CACATCATCCCCACCGAACCAATAATTCATTGTCTGTTGTTGGTAAGAG
GATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTGCACATTGCTCGNGGTTGNCCTAAAA
ATAAATTCNGNCGATTGCAAGCCNTGACCANCCTGGTGGTTGAAANANCT
CNATGNNNGNNNNNANNNNTTGNNNNNNNNNNNNN

>160915-02_C15_74_4_rev.ab1 676

NNNNNNNNNNNCCGNNNGACTGGGGTCNCTTGAAGAGTGTTTGACATAAC
AAACACGTTCAAGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCACA
CACCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCACCA
GGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAATGCGCACGGGAGACCATTT
CCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTCGGTGGG
GATGATGTGTGACACCCAGGCAGACGTGCCCTTGGCCAGGAGGCTTCGGG
CGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACA
CCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCTAGATAT
CCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTGTAATGAAAAAGTGGCCAAGATCACGTT
CGCTTCTTCCGTTTTACGGAACGATCGTGGGCACGACCACATTTAATGCA
AAGTTCCTTGGCGCATACCGCGCCGGGGTGGTNANTTNNNCCNANNGNN
ANTANNCNTGNCNNNNNTANNNNNNNNNANTTACNNTCCNNTGNNNNNNNN
NNNCNANNNNNNNNNCNNNTNTTNNNNNNNNCNGTTGNNNACNANNTNNNN
TNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

>160915-02_M09_55_5a_fwd.ab1 553

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGANCTGCGGAGGANCATTGTGCGAAACCTGCAA
ATGACCCGCGAACTAGTTATCAACATGTTGGGAGAGATGGGAGAAATCCC
ATAGCTTCTTCGTGCCAGTGGAGGGTAATTGTGTCTGTTATAATGGCGGCA
TGATTATTTGACACTCGGACAACTAACCAACCCCGGCGCGGTATGCGCC
AAGGAACTTTGCATTAAATGTGGTCGTGCCACGATCGTTCGGTAAAACG
GAAGAAGCGAACGTGATCTTGGCCACTTTTTCATTACACAAAACGACTCT
CGGCAACGGATATCTAGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCGAAGCCTCCTGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CACATCATCCCCACCGAACCAATAATTCNTTGNCGTTGTTTGGNAANAN
NATGNNNNNANNNNGNNCNCNNNTNTCCNNTGNTNNNNNNNNNNNNNNNC
NNN

>160915-02_E15_75_4_rev.ab1 638

NNNNNNNNNNNCCGNNNGACTGGGGTCNCTTGAAGAGTGNTTGACATAAC
AAACACGTTCAAGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCACA
CACCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCACCA
GGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAATGCGCACGGGAGACCATTT
CCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTCGGTGGG
GATGATGTGTGACACCCAGGCAGACGTGCCCTTGGCCAGGAGGCTTCGGG



CGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACA
CCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCTAGATAT
CCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTGTAATGAAAAAGTGGCCAAGATCACGTT
CGCTTCTTCCGTTTTACGGAACGATCGTGGGCACGACCACATTTAATGCA
AAGTTCCTTGCGCATACCGCGCCGGGGTTGNTTANNTTGTNNNANNNNN
ANNTANTNNTGCCNNNNNNNNNCGACNNNNTTACCCTCNANTGNCNCGAN
TANNCTNTGGNNNNNNNNNNNNNTNNCNNNNNNNNNN

5a_fwd: 5a forward, 4_rev: 4 reverse. n=5



ANEXO 7

Secuencias resultados de la amplificación del *loci* ITS2 del primer forward y reverse-formato FASTA

```
>160915-02_O09_56_S2F.ab1 477
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGNNNCTTTGACGCANGTTGCGCCCGAAGC
CTCCTGGCCNAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACACATCATCCCCACCGA
ACCAAATAATTTCATTGTCGTTGTTTGGTAAGAGGATGGGCGGAAAATGGT
CTCCCGTGCGCATTGCTCGCGGTTGGCCTAAAAATAAATTCCTGGTGATT
GCAAGCCATGACCAGCGGTGGTTGAAAGACCCTCGATGGGTGTTGTGAGA
GCTTGCATCACATGTTGGGAGACTCTGACCCTGAACGTGTTTGTATGTC
AAACACTCTTCAAGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTTAGTAA
CGGCGAGCGAACC GGGAATGCCAGCTTGAAAATCGGACGCCTTTGGTG
TTCGAATTGTAGTCTGGAAAANCGTCA

>160915-02_G15_76_S3R.ab1 467
NNNNNNNNNCGNNNTTNNNGCTGGGCATTTCCCGGTTTCGCTCGCCGTTACT
AAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAAC
TCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCACTTGAAGAGTGTTTGACAT
AACAAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCA
CAACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCA
CCAGGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAATGCGCACGGGAGACCAT
TTTCCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTCGGT
GGGGATGATGTGTGACACCCAGGACAGCTGCCCTTGGCCAGGAGGCTTC
GGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTC
ACACCAANTATCGCATA

>160915-02_A11_57_S2F.ab1 469
NNNNNNNNNNNNNCGAGNCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGGC
CNAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACACATCATCCCCACCGAACCAAATA
ATTCATTGTCGTTGTTTGGTAAGAGGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTG
CGCATTGCTCGCGGTTGGCCTAAAAATAAATTCCTGGTGATTGCAAGCCA
TGACCAGCGGTGGTTGAAAGACCCTCGATGGGTGTTGTGAGAGCTTGCAT
CACATGTTGGGAGACTCTGACCCTGAACGTGTTTGTATGTCAAACACTC
TTCAAGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTTANTAACGGCGAGC
GAACCGGGAAATGCCAGCTTGAAAATCANNANGCCTTTGGTGTTTGAATT
GTANTCTGNNAANCGTCA

>160915-02_I15_77_S3R.ab1 467
NNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNCTGGGCATTTCCCGGTTTCGCTCGCCGTTACT
AAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAAC
TCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCACTTGAAGAGTGTTTGACAT
AACAAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCA
CAACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCA
CCAGGAATTTATTTTTAGGCCAACCGCGAGCAATGCGCACGGGAGACCAT
TTTCCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTCGGT
GGGGATGATGTGTGACACCCAGGACAGCTGCCCTTGGCCAGGAGGCTTC
GGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTC
ACACCAAGTATCGCATA

>160915-02_C11_58_S2F.ab1 469
NNNNNNNNNNNNNCGNNNTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGGC
CAAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACACATCATCCCCACCGAACCAAATA
ATTCATTGTCGTTGTTTGGTAAGAGGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTG
CGCATTGCTCGCGGTTGGCCTAAAAATAAATTCCTGGTGATTGCAAGCCA
TGACCAGCGGTGGTTGAAAGACCCTCGATGGGTGTTGTGAGAGCTTGCAT
```



CACATGTTGGGAGACTCTGACCCTGAACGTGTTTGTATGTCAAACACTC
TTCAAGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTTANTAACGGCGAGC
GAACCGGAAATGCCAGCTTGAAAATCGNANGCCTTTGGTGTTCGAATT
GTANTCTGGAAAANCGTCA

>160915-02_K15_78_S3R.ab1 468

NNNNNNNNNNCNANTTTNNGCTGGGCATTTCCCGGTTTCGCTCGCCGTTAC
TAAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAA
CTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCACTTGAAGAGTGTGTTGACA
TAACAAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTC
ACAACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATC
ACCAGGAATTTATTTTATAGGCCAACC GCGAGCAATGCGCACGGGAGACCA
TTTTCCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTTCGG
TGGGGATGATGTGTGACACCCAGGCAGACGTGCCCTTGCCAGGAGGCTT
CGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATT
CACACCANTATCGCATA

>160915-02_E11_59_S2F.ab1 471

NNNNNNNNNNNTCGNGTCTTTGACGCNAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGG
CCNAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACACATCATCCCCACCGAACC AAAAT
AATTCATTGTCGTTGTTTGGTAAGAGGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGT
GCGCATTGCTCGCGGTTGGCCTAAAAATAAATTCCTGGTGATTGCAAGCC
ATGACCAGCGGTGGTTGAAAGACCCTCGATGGGTGTTGTGAGAGCTTGCA
TCACATGTTGGGAGACTCTGACCCTGAACGTGTTTGTATGTCAAACACT
CTTCAAGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAG
CGAACC GGAAATGCCAGCTTGAAAATCGNACGCCTTTGGTGTTCGAAT
TGTA GTCTGGNAAAANCGTCA

>160915-02_M15_79_S3R.ab1 467

NNNNNNNNNNCGNNTTTCAGCTGGGCANTTCCCGGTTTCGCTCGCCGTTACT
AAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAAC
TCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCACTTGAAGAGTGTGTTGACAT
AACAAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCTCTCA
CAACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCAATCA
CCAGGAATTTATTTTATAGGCCAACC GCGAGCAATGCGCACGGGAGACCAT
TTTCCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTTTCGGT
GGGGATGATGTGTGACACCCAGGCAGACGTGCCCTTGCCAGGAGGCTTC
GGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTC
ACACCAAGTATCGCATA

>160915-02_G11_60_S2F.ab1 469

NNNNNNNNNNNNCNNTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCCTGGC
CNAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACACATCATCCCCACCGAACC AAAATA
ATTCATTGTCGTTGTTTGGTAAGAGGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTG
CGCATTGCTCGCGGTTGGCCTAAAAATAAATTCCTGGTGATTGCAAGCCA
TGACCAGCGGTGGTTGAAAGACCCTCGATGGGTGTTGTGAGAGCTTGCA
CACATGTTGGGAGACTCTGACCCTGAACGTGTTTGTATGTCAAACACTC
TTCAAGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGC
GAACCGGAAATGCCAGCTTGAAAATCGGACGCCTTTGGTGTTCGAATT
GTAGTCTGGNNAANCGTCA

>160915-02_O15_80_S3R.ab1 471

NNNNNNNNNNNNCNANTTTNNGCTGGGCATTTCCCGGTTTCGCTCGCCGT
TACTAAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTT
AAACTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCACTTGAAGAGTGTGTTG
ACATAACAAACACGTTTCAGGGTCAGAGTCTCCCAACATGTGATGCAAGCT
CTCACAACACCCATCGAGGGTCTTTCAACCACCGCTGGTCATGGCTTGCA
ATCACCAGGAATTTATTTTATAGGCCAACC GCGAGCAATGCGCACGGGAGA



CCATTTTCCGCCCATCCTCTTACCAAACAACGACAATGAATTATTTGGTT
CGGTGGGGATGATGTGTGACACCCAGGCAGACGTGCCCTTGGCCAGGAGG
CTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCA
ATTCACACCAAGTATCGCATA

S2F: S2 forward, S3R: S3 reverse. n=5